

Rec'd PCT/PTC 30 SEP 2004
PCT/JP 03/00522 #2

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月 2日

REC'D 21 MAR 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-100431

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP 2002-100431]

出願人

Applicant(s):

理化学研究所
株式会社ダナフォーム

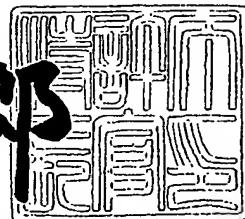
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3013120

【書類名】 特許願
 【整理番号】 02766
 【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/00
 【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 22-1-201
 【氏名】 林崎 良英
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区樽町 3-6-13
 【氏名】 鈴木 治和
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
 【氏名】 金森 瞳
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3-35 株式会社ダナフォーム
 内
 【氏名】 マチアス ハーバーズ
 【特許出願人】
 【識別番号】 000006792
 【氏名又は名称】 理化学研究所
 【特許出願人】
 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3-35
 【氏名又は名称】 株式会社ダナフォーム
 【代表者】 林 利蔵
 【代理人】
 【識別番号】 100088546
 【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【フルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド及びそれをコードする核酸

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～32個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列中、第1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し若しくは欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置に各1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項2記載のポリペプチド。

【請求項5】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中、第1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置に1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有し、TRAF2との結合能を有する請求項2記

載のポリペプチド。

【請求項6】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する請求項
w5記載のポリペプチド。

【請求項7】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第
162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40
個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領
域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項8】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第
162番目のアミノ酸配列を有するペプチド又は該アミノ酸配列において、1～
32個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有す
る領域を含む請求項7記載のポリペプチド。

【請求項9】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第
162番目のアミノ酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、
37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、
100、101、114、117、126、127、134、136、143、
145、147、156、157及び158番目のアミノ酸のうち少なくとも1
個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並
びに第25番目と第26番目の間の位置の少なくともいずれかに各1～3個のア
ミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチ
ド。

【請求項10】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～
第162番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチド。

【請求項11】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ
酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、
44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、1
14、117、126、127、134、136、143、145、147、1
56、157、158、163、165、168、169、170、171、1
72、173、177及び184番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し
、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並びに第25

番目と第26番目の間の位置の少なくともいずれかに1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する請求項8記載のポリペプチド。

【請求項12】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する請求項11記載のポリペプチド。

【請求項13】 配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列と70%以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項14】 前記相同性が80%以上である請求項13記載のポリペプチド。

【請求項15】 配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有し、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

【請求項16】 前記相同性が78%以上である請求項15記載のポリペプチド。

【請求項17】 請求項1ないし16のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項18】 配列表の配列番号2又は4で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸の相補配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズする請求項17記載の核酸。

【請求項19】 請求項17又は18記載の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクター。

【請求項20】 請求項17又は18記載の核酸が導入された細胞であって、請求項1ないし16のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞。

【請求項21】 請求項17又は18記載の核酸とハイブリダイズする核酸であって、請求項17又は18記載の核酸の検出に用いることができる核酸。

【請求項22】 配列表の配列番号2又は4記載の塩基配列を有する核酸とハイブリダイズする請求項21記載の核酸。

【請求項23】 プライマー又はプローブである請求項21又は22記載の核酸。

【請求項24】 塩基数が15以上である請求項21ないし23のいずれか

1項に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍壞死因子レセプター関連因子2(TRAF2)と結合する新規なポリペプチド及びそれをコードする核酸に関する。

【0002】

【従来の技術】

腫瘍壞死因子レセプター関連因子(TRAFs)は、TNFレセプターファミリーを介したシグナル伝達経路上のアダプタータンパク質であることがわかっている。TRAF遺伝子ファミリーは、TRAF1ないしTRAF6の6種類の遺伝子から成り、各タンパク質のカルボキシ末端の保存されたTRAFドメインにより特徴付けられる(1-5)。TRAFファミリーの中で、TRAF2は、TNF-媒介シグナル伝達経路に包含される。TNFレセプター1(TNFR1)がTNFにより刺激されると、TNFR1が、TRADD(TNFR-関連死ドメインタンパク質(TNFR-associated death domain protein)のアミノ末端を介して間接的にTRAF2を集める(6,7)。活性化されたTRAF2は、NF- κ B及びAP-1の活性化を媒介するRIP(8,9)及びASK1(10)を包含する数種類のタンパク質を集め、その結果、細胞性又は免疫性の機能を有する多くの遺伝子が誘導される(11,12)。TRAF2の相互作用に加え、TRADDはまた、deathドメインを有するアダプター分子であるFADDと相互作用する(13)。FADDは、細胞死プロテアーゼカスケードの開始プロテアーゼであるキャスパーーゼ(caspase)-8を集めて活性化し、アポトーシスを引き起こす(14)。従って、TRAF2は、TNF-媒介細胞生存において鍵となる分子であり、ここでは種々のタンパク質がTRAF2との相互作用によってシグナル伝達経路を制御している。

【0003】

従って、TRAF2と結合する新規なタンパク質を見出し、特徴付けることは、TNF-媒介シグナル伝達経路に関与する生理学的及び病理学的過程の理解にとって重要である。また、このようなタンパク質は、TNF-媒介シグナル伝達経路が関与する疾病の診断および治療の対象としての用途を有する可能性がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、TRAF2と結合する新規なタンパク質及びそれをコードする核酸を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、銳意研究の結果、マウスcDNAライブラリーから、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ(mammalian two-hybrid assay)により、TRAF2と結合する新規なタンパク質をコードするcDNAを見出し、かつ、これによりコードされるタンパク質がTRAF2と結合することを実験的に確認して本発明を完成了。

【0006】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

下記実施例に詳述する方法により、マウス生後3日目の胸腺由来のcDNAラ

イブラリーから、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイの手法を用いて、TRAF2と結合する新規なポリペプチドをコードするcDNAを見出した。その塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号4に示す。配列番号3には、配列番号4に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。このポリペプチドを、「T2BP」(TRAF2-binding protein)と命名した。また、BLASTによる相同性検索により、ヒトの機能未知遺伝子の中からマウスT2BP cDNAと相同性の高いcDNAを見出した。このヒト由来cDNAの塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号2に示す。配列番号1には、配列番号2に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。配列番号1記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウスT2BPと高い相同性(約78%)を有し、また、フォークヘッド関連(forkhead-associated (FHA)ドメインのような特徴的なモチーフを有することから、ヒトT2BPであることは明らかである。このように、本発明のポリペプチド(T2BP)の好ましい実施例は、配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列を有する。

【0008】

下記実施例において、具体的に示されるように、T2BPの第1番目から第162番目までの領域(以下、例えば第1番目のアミノ酸残基を便宜的に「1aa」のように、また、例えば第1番目から第162番目のアミノ酸残基から成る領域を「1-162aa」のように記載することがある)のみから成る欠失変異体が、TRAF2との結合能を示したことから、この領域を含んでいればTRAF2との結合能を有する。また、一般に生理活性を有するポリペプチドのうち、少数のアミノ酸配列が置換し、欠失し又は挿入された場合でも、該生理活性が維持されることがあることは周知である。実際、ヒトとマウスのT2BPでは、1-162aaの領域で32個のアミノ酸残基が相違している(相同性約80%)。従って、本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチドと定義される。置換、欠失、挿入されるアミノ酸数は、上記した32個以下であることが好ましい。

【0009】

配列番号1のアミノ酸配列の1-162aaにおいて、配列番号3のアミノ酸配列の1-162aaと相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。

【0010】

同様に、配列番号3のアミノ酸配列の1-162aaにおいて、配列番号1の1-162aaのアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、配列番号1では、配列番号3の25aaと26aaの間にアミノ酸残基が挿入されていることから、配列番号3の25aaと26aaの間に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。

【0011】

上記の通り、1-162aa断片がTRAF2との結合能を有することは実験的に確認されているが、1-184aa（全長）を有する方がTRAF2との結合能がより高いことからより好ましい。配列番号1のアミノ酸配列において、配列番号3のアミノ酸配

列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、上記の通り、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。同様に、配列番号3のアミノ酸配列において、配列番号1のアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、上記の通り、配列番号1では、配列番号3の25aaと26aaの間にアミノ酸残基が挿入されていることから、配列番号3の25aaと26aaの間に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、上記の通り、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。

【0012】

本発明のポリペプチドを相同性に基づいて規定すると、配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列と70%以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2との

結合能を有するポリペプチドである。配列番号1と3の1-162aaの相同性は、約80%であるので、1-162aaの相同性は80%以上であることが好ましい。また、上記の通り、配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の全長を有することがより好ましいが、この場合の両者の相同性は約78%であるので、全長の相同性は78%以上であることが好ましい。なお、ここで言う、相同性は、図1のBに示されるように、両者のポリペプチドのアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように整列させ、一致しているアミノ酸残基の数を全体のアミノ酸残基の数で除することにより計算できる。なお、このような相同性の計算は、BLASTのような市販のソフトを用いて容易に行うことができる。長さが異なる配列同士を比較する場合には、短い方のアミノ酸残基数で除する。

【0013】

本発明のポリペプチドは、下記実施例に詳述する方法によっても生産できるし、本発明によりそれをコードするcDNAの塩基配列が明らかになったので、RT-PCR等の常法によりポリペプチドをコードする核酸を調製し、それを常法により細胞中で発現させることにより容易に生産することができる。

【0014】

本発明は、また、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。ここで言う「核酸」には、DNAもRNAも包含される。これらの核酸は、上記本発明のポリペプチドを遺伝子工学的に產生する際の鑄型として利用することができる。核酸の好ましい実施例の具体的な塩基配列は、上記の通り配列番号2及び4に示されている。また、上記の通り、置換、欠失、挿入を含むポリペプチドであって、TRAF2との結合能を有するものをコードする核酸も本発明の核酸である。このような核酸は、配列番号2又は4で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸とストリンジエント条件下(すなわち、5×Denhardt's reagent, 6×SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50～65℃で、好ましくは50℃と60℃の2段階、又は、50℃、55℃、60℃、65℃の4段階で反応を行なう)でハイブリダイズするものであることが好ましい。

【0015】

本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターをも提供する。このような発現ベクターは、上記本発明の核酸を市販の発現ベクターのクローニング部位に挿入することにより容易に調製することができ、下記実施例にも具体的に記載されている。また、本発明は、このような本発明の発現ベクターにより上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞をも提供する。このような細胞は、上記本発明の発現ベクターを常法により宿主細胞にトランスフェクトすることにより容易に調製でき、下記実施例にも具体的に記載されている。

【0016】

本発明は、また、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸（以下、便宜的に「検出用核酸」と言うことがある）をも提供する。このような核酸は、PCRやNASBA等の核酸増幅法のプライマーであってもよいし、標識を付したプローブであってもよい。プライマーの場合、ハイブリダイズしないと鑄型核酸の増幅が起きないので、増幅が起きるか否かにより該プライマーとハイブリダイズする本発明の核酸が被検試料中に含まれているか否かを調べることができる。また、プローブの場合、ハイブリダイズしないとプローブの標識が検出されないので、プローブの標識を検出することにより被検試料中に本発明の核酸が存在するか否かを検出することができる。これらの検出用核酸は、検出の特異性を高めるために、塩基数が15以上であることが好ましく、プライマーの場合には塩基数が20～50がより好ましく、プローブの場合には塩基数が20～全長が好ましい。なお、このような検出用核酸は、リアルタイム検出PCRのプライマーに用いることや、プローブの標識を定量すること等により、本発明の核酸の定量に利用することもできる。

【0017】

下記実施例で具体的に示されるように、本発明のポリペプチドは、NF- κ Bシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ Bシグナルを減弱させることが可能である。よって、NF- κ Bシグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF- κ Bシグナルは破骨細胞の活

性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発のためのターゲットとしても有用である。さらに、本発明の検出用核酸は、T2BP遺伝子の発現量の測定に用いることができるので、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの病態のモニターに使用することが可能である。また、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの治療薬が、T2BP遺伝子の発現を抑制するものである場合やアンチセンスRNAであるような場合には、これらの治療薬の薬効の評価に用いることもできる。

【0018】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。実験はすべてマウスT2BPを用いておこなった。

【0019】

材料及び方法

細胞培養

10%熱不活化ウシ胎児血清(FBS)、200 U/mlペニシリン及び $200\mu g/ml$ ストレプトマイシンを添加した最少必須培地中で、ヒト胎児腎臓セルライン293 (Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R.:J Gen Virol,36,59-74 (1977))。理化学研究所細胞バンクから入手)を培養した。293T細胞 (DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP: Mol Cell Biol 7, 379-87 (1987)) 及びCHO-K1細胞 (Kao, F. T., Puck, T. T.:Proc Nat Acad Sci U S A,60,1275-1281 (1968))。理化学研究所細胞バンクから入手)は、それぞれ10% FBS 及び抗生物質を添加した、ダルベッコ修飾イーグル培地及びF-12栄養混合培地(Ham's F-12)中でそれぞれ維持した。

【0020】

哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ

公知の方法(15)に従い行った。すなわち、先ず、次のようにして2段階PCRによりアッセイ用サンプルを調製した。T2BP及びTRAF2のcDNA (それぞれマウス生後3日目の胸腺由来のcDNAライブラリー、成マウスの精巣由来のcDNAライブラリー中に含まれる)を鑄型として各々のタンパク質コード領域を含

む領域を、タグを付けた遺伝子特異的プライマー（正鎖プライマーT2BP, gaaggaa
gccgccaccatgtccaccccttgaagacg; 正鎖プライマーTRAF2, gaaggagccgccaccatggct
gcagccagtgt、公知のタンパク領域予測ソフトを用いて設計）及びベクター配列
に対するプライマー（逆鎖プライマーP8; agcggataacaattcacacaggaaa）を
用いたPCRにより増幅した（第1段）。また、SV40 poly-AシグナルのDNA
断片及びGal4 DNA-結合ドメイン又はヘルペスウイルスV16転写活性化ドメインが
後に続くヒトサイトメガロウイルス(CMV)極初期プロモーターを増幅した（用い
た正逆のプライマーの塩基配列および錆型は、それぞれ次のとおり；SV40 poly-
AシグナルのDNA断片, gttcctgttgaaattgttatccgctgcagacatgataagatacattg
(正)、agcaagttcagcctggtaagatccttatcgattttaccac(逆)、pG5luc(Promega社
製); Gal4断片、ccaatatgaccgccatgttggc(正)、catggtggcggctcctccggcgatac
agtcaactg(逆)、pBIND(Promega社製); VP16断片、ccaatatgaccgccatgttggc
(正)、catggtggcggctcctcaagtcgacggatccctggc(逆)、pACT(Promega社製)
）。第2段のPCRでは、第1のPCR産物と、SV40 poly-Aシグナル断片と、
Gal4又はVP16断片とを連結し、PCR産物がGal4又はVP16ドメインとの融合タン
パク質として発現されるように設計した。なお、第2段のPCRで用いたプライ
マーナーの塩基配列は、gccatgttggcattgattattgac(正)及びagcaagttcagcctggtaa
g(逆)であった。得られたPCR産物(0.13 μl)を、20 ngのレポータープラス
ミドpG5lucとともに 2.2×10^4 個のCHO-K1細胞にトランスフェクション試薬LF200
(Invitrogen社製)を用いてトランスフェクトした。20時間インキュベートし
た後、Steady-Glo(商品名)ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社製)に
よりルシフェラーゼレポーター活性を測定した。

[0021]

免疫共沈降分析

T2BP及びTRAF2 cDNAのタンパク質コード領域を含む領域を、遺伝子特異的プライマー（T2BPの正鎖用プライマーの塩基配列； gacgcgtcgaccatgtccacctt tgaagacg、 TRAF2の正鎖用プライマーの塩基配列； gacgcgtcgaccatggctgcagccagt gt。逆鎖用プライマーはベクター部位に対して作成し、 塩基配列はccggtaagcgg ccgcagcggataacaattcacacaggaaac）を用いたPCRにより増幅した後に制限酵

素SalIおよびNotIで消化した断片を、発現ベクターpCMV-HA及びpCMV-Myc（いずれもClontech社製）にそれぞれサブクローニングした。トランスフェクション試薬LF2000（商品名）を用い、HA-T2BP又はMyc-T2BPを発現するための発現用ベクター2.5 μgで293T細胞(1×10^6 個)をトランスフェクトした。なお、HA又はMycは抗体が認識するタグ配列の名前を意味する。24時間インキュベートした後、細胞を回収し、10 mM of Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40（商品名），0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 10 μg/mlロイペプチド(PEPTIDE INSTITUTE Inc. 製)から成るTNE緩衝液で溶解した。10,000 × gで15分間遠心後、上清を単離し、5 μgの抗HAタグ抗体（Santa Cruz社製）で免疫沈降させた。共沈殿したMyc-TRAF2の検出は、ウェスタンプロット分析により行った。Laemmuliサンプル緩衝液中の試料を5分間煮沸し、12.5% SDS-PAGEにかけ、タンパク質をHybond-ECL膜（Amersham社製）に転写した。ウェスタンプロットは、抗Mycタグ抗体と1時間、次いでHRP-結合抗マウス Ig G (Amersham社製)と1時間インキュベートし、次いで洗浄を行う、通常の方法により行った。シグナルの検出は、ECLシステム（Amersham社製）及びX-線フィルム(Kodak社製)を用いて行った。また、培養上清を、上記した一次抗体及び二次抗体を用いた直接的なウェスタンプロットに付すことにより、HA-T2BP及びMyc-TRAF2の発現を確認した。

【0022】

ノーザン分析

T2BP及びTRAF2 cDNAを、ノーザンプロット分析のプローブとして用いた。Random Primer Labeling Kit Ver. 2（宝酒造社製）を用いて、プローブを [32 P] で標識した。マウスMTNプロット膜およびマウスセルラインMTNプロット膜（いずれもClontech社製）を購入した。ExpressHyb（商品名）ハイブリダイゼーション溶液(Clontech社製)を用い、68 °Cで30分間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションシグナルは、X-線フィルムにより検出した。

【0023】

シグナル伝達経路分析

T2BPの発現ベクターを、100 ngのレポーターベクターpNF κB-Luc又はpAP1-Luc (Clontech社製)とともに、トランスフェクション試薬LF2000を用いて、96穴

アッセイプレート中の 5×10^4 個の293細胞にトランスフェクトした。24時間インキュベート後、細胞を5 ng/mlのTNFで6時間処理し(+)又は処理しなかった(-)。レポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性は上記の通りに測定した。

【0024】

結果

FHAドメインを有する新規なTRAF2結合タンパク質T2BPの同定

本願発明者らは、哺乳動物2ハイブリッド法に基づく、PCR-媒介サンプル調製及び高効率アッセイシステムを開発したことを報告している(15)。このシステムを用い、マウス全長cDNAが豊富に含まれるライブラリーから得た約6000個のcDNAをマトリックス的に分析した。T2BP(TRAF2結合タンパク質)と命名された新規なTRAF2相互作用タンパク質が、VP16転写活性化ドメインに融合されたTRAF2をプレイ(prey)として用いた時に同定された(図1のA)。マウスT2BPのcDNA配列(配列番号4)は、5個のA+TリッチモチーフATTTAを3'非翻訳領域中に含む。これは、サイトカインや癌原遺伝子のような多くの短命mRNA中に見出されるものであり、従って、潜在的な不安定化要素である(16,17)。図1のBに示されるように、T2BPは、184個のアミノ酸残基から成り、等電点(pI)が4.79で分子量が21560と計算される。Pfamモチーフデータベース検索(<http://pfam.wustl.edu/index.html>)によりモチーフ解析を行ったところ、リン酸化ペプチド結合モチーフ(18,19)として知られるフォークヘッド関連(forkhead-associated (FHA))ドメインがT2BPの中央領域に位置することがわかった。さらに、BLASTにより相同性検索を行ったところ、マウスT2BPのヒトオーソログが同定された(図1のB、配列番号1、2)。マウス及びヒトT2BPは、アミノ酸配列全体に亘り高度に保存されていた。

【0025】

なお、図1のAは、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイの結果を示す。プレイ-TRAF2及び/又はバイト(bait)-T2BPを、レポーターベクターpG5lucと共にCHO-K1細胞にトランスフェクトしてレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性を測定した。プレイ-TRAF2又はバイト-T2BPトランスフェクションについての平均値を基礎にして相対値を計算した。

【0026】

図1のBは、マウス及びヒトT2BP(それぞれmT2BP及びhT2BPと記載)のアミノ酸配列を示す。両者において同一のアミノ酸残基は、背景に影をつけて示した。FHA領域は枠で囲んで示す。マウス及びヒトT2BPのアミノ酸配列は、cDNAから推定したものである。

【0027】

T2BPは、TRAF2のTRAFドメインと相互作用する

TRAF2は、図2のAに示すように、数種類の周知のモチーフ(1-4)を有するアダプタータンパク質である。どのモチーフがT2BPとの相互作用に関わるのかを調べるために、本願発明者らは、哺乳動物2-ハイブリッド法を用いて野生型TRAF2及びその欠失変異体との相互作用を調べた。その結果、最小の相互作用領域は、TRAFドメインとして知られる、カルボキシ末端側の半分を包含することがわかった。TRAFドメインは、TRAF-N及びTRAF-Cサブドメインに分けられる(20)。T2BPは、TRAF2[1-357]及びTRAF2[348-501]のいずれとも相互作用しなかったので、T2BPとの相互作用には両方のサブドメインが必要と考えられる。また、インビトロでGST-プルダウンアッセイを用いて同じ結果が得られている。次いで、TRAF2との相互作用に関与するT2BP中の領域を調べた(図2のB)。調べた欠失変異体のうち、T2BP[1-162]以外の変異体は、TRAF2との結合能を喪失していた。

【0028】

なお、図2のAは、TRAF2及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型T2BPとの相互作用を示す。図2のBは、T2BP及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型TRAF2との相互作用を示す。

【0029】

T2BPとTRAF2との相互作用の免疫共沈降解析

T2BPとTRAF2との相互作用は、免疫共沈降法によりin vivoで確認された(図3)。本願発明者らは、HA-タグを付けたT2BP及びMyc-タグを付けたTRAF2を產生する発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを293T細胞にトランスフェクトし、細胞抽出物を、抗HAタグ抗体を用いて免疫沈降に付した。抗Mycタグ抗体を用いたウェスタンプロット(図3の上段)により、Myc-TRAF2がHA-T2BPと特異

的に免疫共沈降されたことが示された。

【0030】

なお、図3の中段は、細胞抽出物をウェスタンプロットに付し、HA-T2BPの発現を確認したもの、下段は同様にMyc-TRAF2の発現を確認したものである。また、図3において、IP及びIBはそれぞれ免疫沈降及び免疫プロットを示す。

【0031】

T2BPの発現プロフィール

TRAF2とT2BPがこれらの間で相互作用を行うためには、これらが同じ組織で共に発現していることが必要であるので、ノーザンプロット分析によりT2BP及びTRAF2の発現プロフィールを調べた。T2BP cDNAをプローブとして用いた場合、2.3 kbのシグナルが検出された。これは得られたcDNAのサイズである2.0 kbに対応する、合理的なサイズであった。T2BPは、成体の主な組織において普遍的に発現されていた（図4）。主なシグナルに加え、T2BPについて3.0 kbと4.0 kbに弱い2つのシグナルが観察された。TRAF2 cDNAをプローブとして用いた結果からわかるように、TRAF2遺伝子は、成体の主な全ての組織中で同様に発現されており、これは先の報告(21)と一致している。次に、どのようなマウス培養細胞株においてT2BPが良く発現しているかを調べた。調べた培養細胞株は、PU5-1.8(PU5-R)，RAW264.7，K-BALB(K-234)，M-MSV-BALB/3T3，L-M，P19，Hepal-6，R1.1，L1210，P388D1，P815及びNB41A3であった。これらのうち、T2BPは、RAW264.7，L1210，P388D1といった免疫系細胞由来の培養細胞で高発現していることが明らかとなつた。

【0032】

T2BPをトランスフェクトした293細胞中でのNF- κ B及びAP-1の活性化

NF- κ B及びAP-1のTNF-誘導活性化は、293細胞を包含する数種類のセルラインにおいて良く確立されており、そこでは、TRAF2がシグナル伝達において鍵となる役割を果たす(11,22)。これらの経路に対するT2BPの効果を調べるために、ルシフェラーゼ活性によりNF- κ Bの活性化を検出することを可能にするレポーターベクターと共に、293細胞中でT2BPを過剰発現させた（図5の左）。レポーターベクターのみをトランスフェクトした293細胞をTNF処理すると、NF- κ B

の活性化が明瞭に観察された。T2BPの過剰発現により、TNF処理なしでNF- κ Bが濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト293細胞をTNF処理した場合には、TNF処理していないT2BP-トランスフェクト293細胞と同等か僅かに低いNF- κ Bの活性化が見られた。AP-1の活性化に対するT2BPの効果を評価するため同様な実験を行った（図5の右）。TNF処理したコントロール293細胞中で、AP-1の活性化が観察された。TNFで処理していない293細胞中でT2BPを過剰発現させると、AP-1が濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト細胞をTNF処理した場合、TNF処理していないT2BP-トランスフェクト細胞よりもAP-1の活性化が少なかった。このように、これらの結果は、T2BPの過剰発現により、NF- κ B及びAP-1の両方が、TNF処理なしで活性化されることを示している。

【0033】

文献

1. Bradley, J. R., and Pober, J. S. (2001) Oncogene 20, 6482-6491.
2. Wajant, H., Henkler, F., and Scheurich, P. (2001) Cell Signal 13, 389-400.
3. Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000) Exp Cell Res 254, 14-24.
4. Wajant, H., Grell, M., and Scheurich, P. (1999) Cytokine Growth Factor Rev 10, 15-26.
5. Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1998) Oncogene 17, 3261-3270.
6. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995) Cell 81, 495-504.
7. Shu, H. B., Takeuchi, M., and Goeddel, D. V. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93, 13973-13978.
8. Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (1995) Cell 81, 513-523.
9. McCarthy, J. V., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998) J Biol Ch

em 273, 16968-16975.

10. Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) Mol Cell 2, 389-395
11. Baud, V., and Karin, M. (2001) Trends Cell Biol 11, 372-3
- 77.
12. Baud, V., Liu, Z. G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M. (1999) Genes Dev 13, 1297-1308.
13. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995) Cell 81, 505-512.
14. Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (2000) J Biol Chem 275, 10838-10844.
15. Suzuki, H., Fukunishi, Y., Kagawa, I., Saito, R., Oda, H., Endo, T., Kondo, S., Bono, H., Okazaki, Y., and Hayashizaki, Y. (2001) Genome Res 11, 1758-1765.
16. Wilson, G. M., and Brewer, G. (1999) Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 62, 257-291.
17. Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001) Gene 265, 11-23.
18. Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R., and Walker, J. C. (2000) J Cell Sci 113 Pt 23, 4143-4149.
19. Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R., and Jackson, S. P. (1999) Mol Cell 4, 387-394.
20. Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995) Science 267, 1494-1498.
21. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994) Cell 78, 681-692.
22. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995) Science 269, 1424-1427.
23. Hofmann, K., and Bucher, P. (1995) Trends Biochem Sci 20,

347-349.

24. Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 272, 936-945.
25. Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1996) *J Biol Chem* 271, 19935-19942.
26. Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Li, X. (2001) *J Biol Chem* 276, 41661-41667.
27. Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1992) *Immunol Res* 11, 81-90.
28. Wajant, H., and Scheurich, P. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* 33, 19-32.
29. Gravallese, E. M., Galson, D. L., Goldring, S. R., and Aueron, P. E. (2001) *Arthritis Res* 3, 6-12.
30. Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. (2001) *Embo J* 20, 1271-1280.
31. Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A., and Abu-Amer, Y. (2001) *J Biol Chem* 276, 563-568.

【0034】

【発明の効果】

本発明により、TRAF2と結合する新規なポリペプチド及びそれをコードする核酸が初めて提供された。本発明のポリペプチドは、TRAF2と結合するので、TRAF2が介在するシグナル伝達の研究において重要である。また、本発明のポリペプチドは、NF- κ Bシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ Bシグナルを減弱させることができある。よって、NF- κ Bシグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF- κ Bシグナルは破骨細胞の活性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発のためのターゲットとしても有用である。

[0035]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Novel Polypeptide and Nucleic Acid Encoding the Same

<130>

<160>

[0036]

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu

1 5 10 15

Gln Met Thr Val Tyr His Pro Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile
20 25 30

Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys

35 40 45

Phe Gly Arg Asn Ser Asn Ile Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln

50 55 60

Val Ser Arg Val Gln Phe Ser Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser

65 70 75 80

Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Le

85 90 95

85 90 95

Ile Val Asp Ser Arg Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro

100 105 110

Tyr Arg Cys Met Val Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys

115	120	125
Glu Asp Gly Glu Ser Leu Glu Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser		
130	135	140
Pro Arg Ser Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile		
145	150	155
160		
Pro Glu Tyr Gly Thr Tyr Ser Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Ser Pro		
165	170	175
Thr Glu Met Asp Glu Asn Glu Ser		
180		

【0037】

<210>	2					
<211>	1613					
<212>	DNA					
<213>	Homo sapiens					
<400>	2					
ggcacgaggg	agaggacgtg	ctctgccagc	cagtgggaag	gcaggccgcg	cgcgcgaggag	60
cgcgggagga	tcggcggctc	gccccactg	gtccctggct	cggttccccg	caccccggggg	120
ctcacactta	cccgcgcgga	ggagcagcgg	ccgggtgtcc	accccatcc	tgcgcccagt	180
ctcctcgatt	cccctcgctc	tgagccggga	gagccgaaca	gctgaagaga	gttcaactgac	240
tccccagccc	caggtgggcc	tttgtcacat	c atg acc agt	ttt gaa gat	gtc	292

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala

1	5
---	---

gac aca gaa gag aca gta act tgt ctc cag atg acg gtt tac cat cct	340	
Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Val Tyr His Pro		
10	15	20
ggc cag ttg cag tgt gga ata ttt cag tca ata agt ttt aac aga gag	388	
Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu		
25	30	35
aaa ctc cct tcc agc gaa gtg gtg aaa ttt ggc cga aat tcc aac atc	436	

Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys Phe Gly Arg Asn Ser Asn Ile
 40 45 50 55
 tgt cat tat act ttt cag gac aaa cag gtt tcc cga gtt cag ttt tct 484
 Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser Arg Val Gln Phe Ser
 60 65 70
 ctg cag ctg ttt aaa aaa ttc aac agc tca gtt ctc tcc ttt gaa ata 532
 Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile
 75 80 85
 aaa aat atg agt aaa aag acc aat ctg atc gtg gac agc aga gag ctg 580
 Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Leu Ile Val Asp Ser Arg Glu Leu
 90 95 100
 ggc tac cta aat aaa atg gac ctg cca tac agg tgc atg gtc aga ttc 628
 Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Arg Cys Met Val Arg Phe
 105 110 115
 gga gag tat cag ttt ctg atg gag aag gaa gat ggc gag tca ttg gaa 676
 Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys Glu Asp Gly Glu Ser Leu Glu
 120 125 130 135
 ttt ttt gag act caa ttt att tta tct cca aga tca ctc ttg caa gaa 724
 Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser Pro Arg Ser Leu Leu Gln Glu
 140 145 150
 aac aac tgg cca cca cac agg ccc ata ccg gag tat ggc act tac tcg 772
 Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile Pro Glu Tyr Gly Thr Tyr Ser
 155 160 165
 ctc tgc tcc tcc caa agc agt tct ccg aca gaa atg gat gaa aat gag 820
 Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Pro Thr Glu Met Asp Glu Asn Glu
 170 175 180
 tca tgaacacaga aagtctaaga ggagaaaatat gatggatgaa gagctctgta 873
 Ser

gatgcgttat agacactaaa taagagttga ttagggtagt atattatagt catctgttat 933
 gctgtgaaat ttggaattca aaattttgaa gtctgtaaat tgtgttagtc attaacttag 993
 tcacctgttg tattctggat ctacacaaaa ttatTTtaag tgctcttatt aatcigttag 1053ga
 ttaatata caaaaagtat cctttgagat gaagtcgtgt tctaaaata agttatatt 1113
 attttcttt tctgcttgat tttcatcttg tgTTTgctt tgTTTgtta aggaaccatc 1173
 tcttggtttg gtcacatcag ttcacaacag ccattgttt tcaaggtaaa ggctccaggc 1233
 aggttgttac tgggtttgc agcctgtcag tactgcagt actggaatag gttctaggct 1293
 agtgtctgcg cgtcaactgtg gtttagcat gggaggactt atttgagaaa tactaccta 1353
 ctTTTctatg atttctttt acagagttat agtgtgtta ctcctaagat gacagttctc 1413
 tttgtctata ttcagcatct aagacaata tttaaacatt ttaagaacc actgtgttaa 1473
 gtttaggatt atttacttac caaatttagaa gtttgacttt tatgtgttat acacaatctt 1533
 aaaatttcac gaattcacct tttaatagt atccatgtac ataataaaat caaagttaa 1593
 ttaaaaaaaaaaaaaaaa 1613

[0038]

<210> 3
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 3

Met Ser Thr Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Met Thr Ile Tyr His Pro Gly Gln Gln Ser Gly Ile Phe Lys Ser

20	25	30
----	----	----

Ile Arg Phe Cys Ser Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ile Glu Val Val Lys

35	40	45
----	----	----

Phe Gly Arg Asn Ser Asn Met Cys Gln Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln

50	55	60
----	----	----

Val Ser Arg Ile Gln Phe Val Leu Gln Pro Phe Lys Gln Phe Asn Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Ser Leu
 85 90 95
 Met Val Asp Asn Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro
 100 105 110
 Tyr Lys Cys Met Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys
 115 120 125
 Glu Asp Gly Glu Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser
 130 135 140
 Ser Arg Pro Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile
 145 150 155 160
 Pro Glu Asp Gly Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro
 165 170 175
 Ser Glu Met Asp Glu Asn Glu Leu
 180

【0039】

<210> 4
 <211> 1970
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 4

gagtttagag cagttgtcc cgcgtgcgca gctgggttgt cagtgcgtcg gtgtacctaa 60
 cacaccgaca cagacccttc tttttctcc caggagagga gacaaggctc aggagtcctg 120
 atctagctgt ggccactgga agactctcag gccggggagc gtc atg tcc acc ttt 175

Met Ser Thr Phe

1

gaa gac gct gat aca gag gag acg gtc act tgt ctc cag atg acc att 223
 Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Ile
 5 10 15 20
 tac cat cct ggc caa caa agt ggg ata ttt aaa tca ata agg ttt tgc 271

Tyr His Pro Gly Gln Gln Ser Gly Ile Phe Lys Ser Ile Arg Phe Cys

25

30

35

agc aaa gag aag ttt cct tcc att gaa gtg gtg aaa ttt gga cgc aat 319

Ser Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ile Glu Val Val Lys Phe Gly Arg Asn

40

45

50

tcc aac atg tgc cag tat acg ttt cag gac aaa cag gtg tcc cga att 367

Ser Asn Met Cys Gln Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser Arg Ile

55

60

65

cag ttt gtt tta cag ccg ttt aaa cag ttc aac agc tcc gtt ctc tcg 415

Gln Phe Val Leu Gln Pro Phe Lys Gln Phe Asn Ser Ser Val Leu Ser

70

75

80

ttt gaa ata aaa aac atg agc aag aaa acc agt ttg atg gta gac aac 463

Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Ser Leu Met Val Asp Asn

85 90 95 100

cag gag ctc ggc tac ctc aat aaa atg gac ctg cct tac aag tgt atg 511

Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Lys Cys Met

105

110

115

ctc agg ttc gga gag tat cag ttc ctg ttg cag aag gaa gac gga gag 559

Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys Glu Asp Gly Glu

120

125

130

tcg gtg gaa tct ttt gag act caa ttt atc atg tct tca aga cct ctc 607

Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser Ser Arg Pro Leu

135

140

145

ttg caa gaa aac aac tgg cca aca cag aat ccc ata cca gag gat ggg 655

Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile Pro Glu Asp Gly

150

155

160

atg tat tct tca tac ttc acc cac aga agt tct cct tca gaa atg gat 703

Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro Ser Glu Met Asp

165

170

175

180

gaa aac gaa ctg tgaagagggt ccaactggag acacattgaa ggatgaggac 755

Glu Asn Glu Leu

acatgggtcg gatgtcaaga gacatcctac ttccgagttt gtgagtgtag ctagcgcgg 815
 ctgtcctcat gctgactttc gtttggtaa tagcattgg aagtctctag actgtgttaa 875
 tcatcaactt agtcaactga gtttcggctc tacaaagaat taagtgtaca tctgttaagg 935
 ttggtgcatc agacacgtct tctggtaat gaggtcaccc ttgttgcttt tctgcata 995
 gttaccccca tgctttgtct tggggcagc catctttgg cccggtcaca tcatttcgta 1055
 gcagcccttg ttttcaggt ttagagctcg ggcagattgc tcactgggt ctgtggcgtg 1115
 ctagcgcttg tagaactaga gtcctgaaat aagttctaga gtgctgagtc actgagtcac 1175
 catggcttcc ttatggaaag acttggaaa tagtccttg atttcttgc tggaaacgg 1235
 tagtgtcgct ttcctatatg taggacctac aacaaacatt taaagaacac tgagatgaag 1295
 atggtttct tacaatattt aagtgaatt ttatgtatct cacagattt aaaaatggcag 1355
 aaatcaaaac ttttaacagc ctcttgac atgataaagc cggagcccag ttccttagtt 1415
 gcttccttg aacttctaa aggaaaacat gtattctaa aggaaaacat ctattcttag 1475
 gctgccctat agaagtcaat acctgtaat atttatattt aatgcttaat tatttctaaa 1535
 attttagttt cacataaaatgt tgtatattt taaaagattc tcattcactt cattttggct 1595
 agattaagat gaatgttagt gaacattatg taaaagagga taaaagccat taagttttaga 1655
 taaaattctat cattactatgt aagtaaggca ccctgtatag cttcctctgt aaatgaaatt 1715
 taatgctgtat acaggatcacag gatttgggt aggggaggag gtcaggtggg ggaagttac 1775
 cacattcata ttttgggg tttttgttt ttgtttgtt ttttgggg caacaatagc 1835
 ttgccttgaa gctcaggctg gcttggaaact cttgatcctc atacatcgcc cccctgaatg 1895
 ctgtgccttag cttaatgtaa ctgtatttct gcaacagccc tttgaaatata 1955
 actgtttggc ctatgt 1970

[0040]

- <210> 5
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

gaaggagccg ccaccatgtc caccttgaa gacg

34

【0041】

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

gaaggagccg ccaccatggc tgcagccagt gt

32

【0042】

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

agcgataaac aattcacac aggaaa

26

【0043】

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

gtttcctgtg tgaaatttgtt atccgctgca gacatgataa gatacattg

49

【0044】

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

agcaagttca gcctggtaa gatccttatac gattttacca c

41

【0045】

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

ccaatatgac cgccatgttg gc

22

【0046】

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

catggtggcg gtccttccg gcgatacagt caactg

36

【0047】

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 12
ccaatatgac cgccatgttgc

22

【0048】

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 13
catggtgccgc gctccttcaa gtcgacggat ccctggc

37

【0049】

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 14
gccatgttgg cattgattat tgac

24

【0050】

<210> 15

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 15
agcaaggta ggcgtggtaa g

21

[0051]

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 16
gacgcgtcga ccatgtccac ctttgaagac g

31

[0052]

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer for PCR
<400> 17
gacgcgtcga ccatggctgc agccagtgt

29

[0053]

<210> 18
<211> 43
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ccggtaagc ggccgcagcg gataacaatt tcacacagga aac

43

【図面の簡単な説明】

【図1】

Aは、哺乳動物2-ハイブリッド法の結果を示し、Bは、ヒト及びマウスT2BPのアミノ酸配列を比較して示す図である。

【図2】

Aは、TRAF2及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型T2B Pとの相互作用を示し、Bは、T2BP及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型TRAF2との相互作用を示す。

【図3】

本発明の実施例で行った、T2BPがTRAF2と結合することを示す免疫共沈降の結果を示す図である。

【図4】

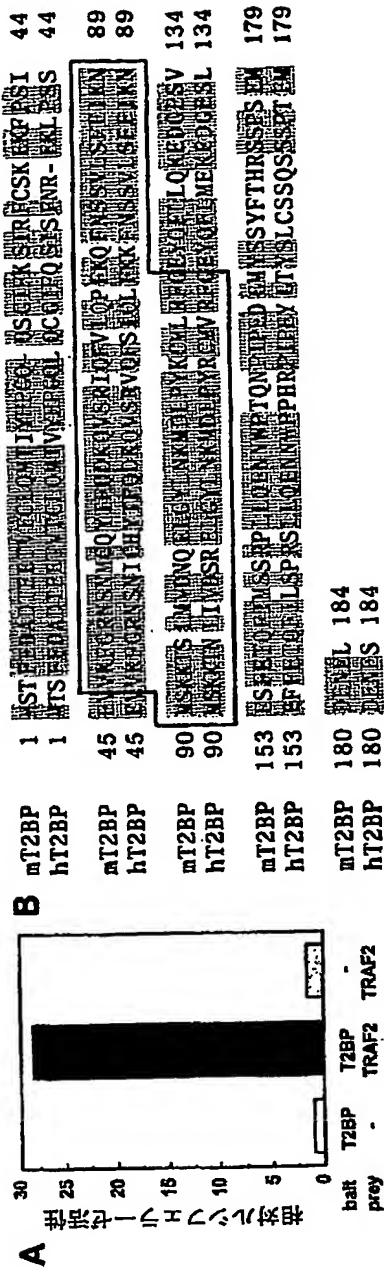
本発明の実施例で行った、各種組織中のT2BPの発現を示す、ノーザンプロット分析の結果を示す図である。

【図5】

本発明の実施例で行った、T2BPをトランスフェクトした293細胞中でのNF- κ B及びAP-1の活性化を示す、T2BP量と相対ルシフェラーゼ活性の関係を示す図である。

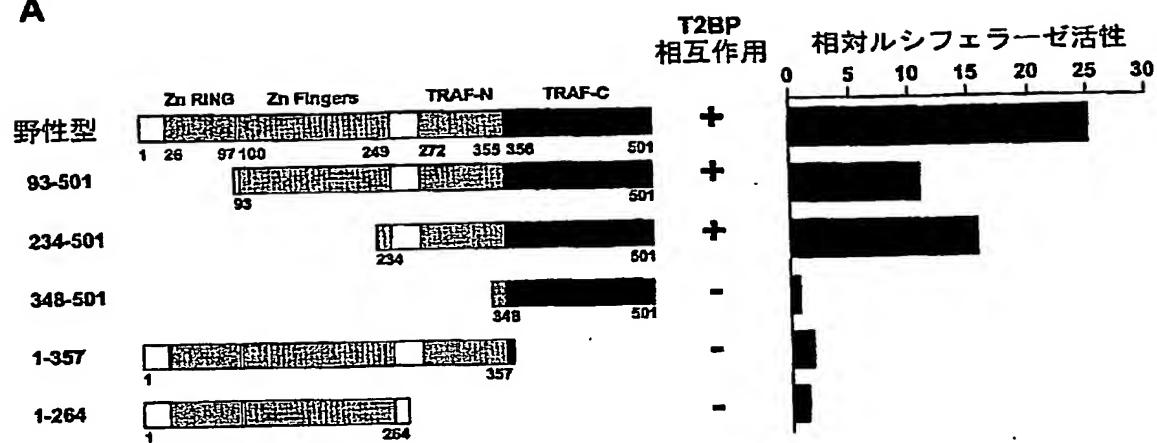
【書類名】 図面

【図1】

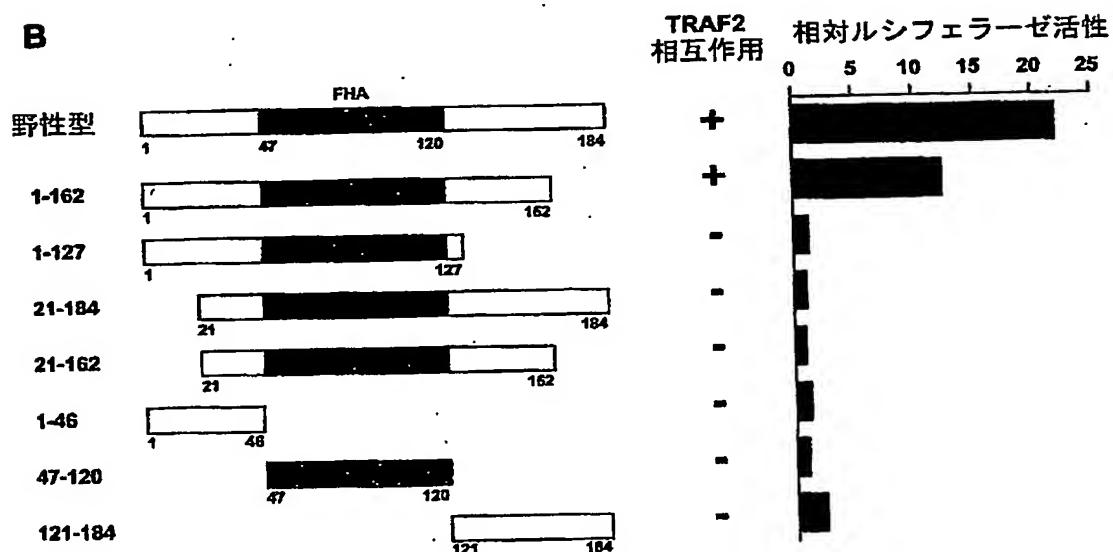


【図2】

A

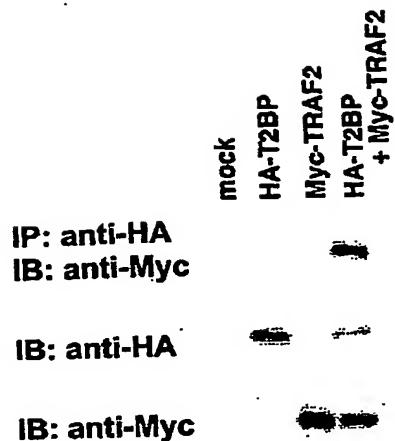


B

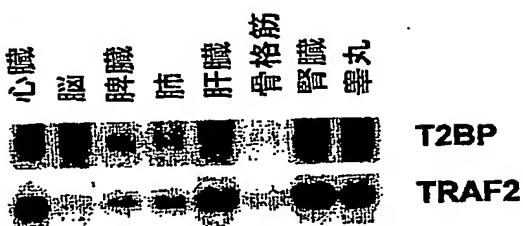


特2002-100431

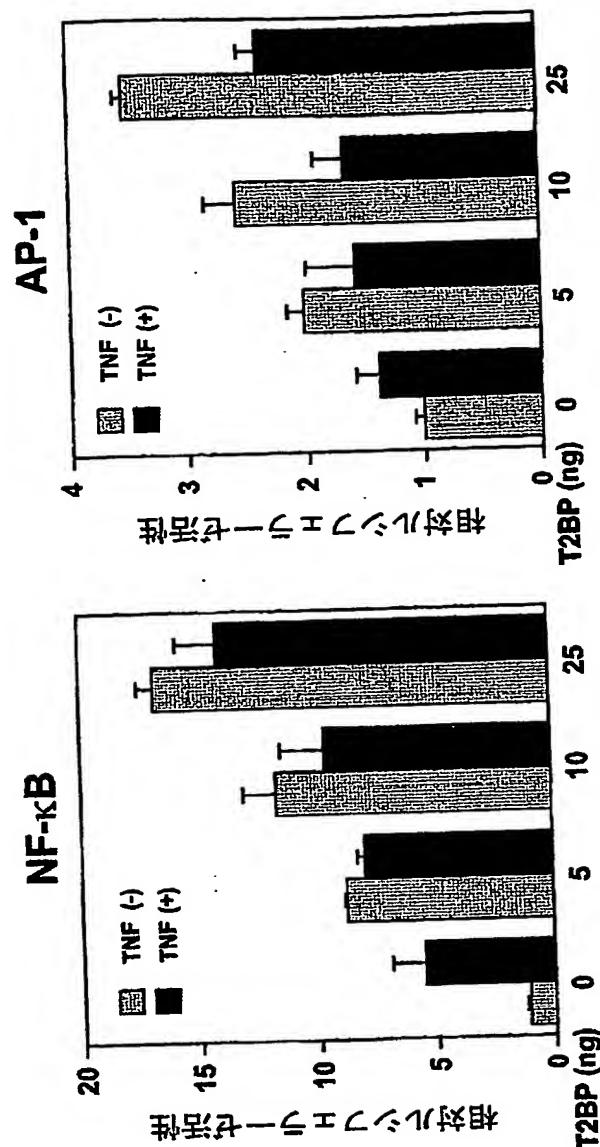
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肿瘍壞死因子レセプター関連因子(TRAF2)と結合する新規なタンパク質及びそれをコードする核酸を提供すること。

【解決手段】 マウス cDNAライブラリーから、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ(mammalian two-hybrid assay)により、TRAF2と結合する新規なタンパク質をコードするcDNAを見出し、かつ、これによりコードされるタンパク質がTRAF2と結合することを実験的に確認し、その塩基配列を決定した。

【効果】 本発明のポリペプチドは、TRAF2と結合するので、TRAF2が介在するシグナル伝達の研究において重要である。また、本発明のポリペプチドは、NF- κ Bシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ Bシグナルを減弱させることが可能である。

【選択図】 図2

特2002-100431

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-100431
受付番号	50200476398
書類名	特許願
担当官	第五担当上席
作成日	平成14年 6月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 4月 2日

次頁無

特2002-100431

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名 理化学研究所

特2002-100431

出願人履歴情報

識別番号 [501293666]

1. 変更年月日 2002年 3月26日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区三田1丁目3番35号
氏 名 株式会社ダナフォーム